*BMP7*基因沉默抑制钙盐诱导猪主动脉瓣膜间质细胞成骨分化

程瑜 施琼 安利钦 范梦恬 皇改改 翁亚光**

(重庆医科大学检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016)

摘要 目的：探究小干扰 RNA(small interference RNA，siRNA)介导的骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein7,*BMP7*)基因沉默对钙盐诱导猪主动脉瓣膜间质细胞成骨分化的影响及机制，为钙化性主动脉瓣膜病（calcific aortic valve disease，CAVD）的干预及治疗提供理论依据。 方法：非 CAVD 瓣膜组织(non-CAVD 组)取自手术治疗的主动脉夹层患者，CAVD 瓣膜组织(CAVD 组)取自因钙化性主动脉瓣狭窄而进行主动脉瓣膜置换术的患者，采用免疫组化和 Western blot 法检测 non-CAVD 组和 CAVD 组中 BMP7、Runt 相关转录因子 2(Runx2)的蛋白表达水平。选取健康家猪处死后即刻于无菌条件下取主动脉瓣叶，采用胶原酶连续消化法分离主动脉瓣膜间质细胞，观察其形态特征，并用免疫荧光染色行表型鉴定。采用脂质体转染法将 BMP7-siRNA 转染猪主动脉瓣膜间质细胞，采用 qPCR 和 Western blot 法验证 BMP7 表达的变化;利用钙盐培养基诱导细胞成骨分化，建立体外主动脉瓣膜间质细胞钙化模型后，采用 ALP 染色和茜素红 S 染色实验分别检测细胞早期及晚期成骨分化能力;采用 qPCR 和 Western blot 法分别检测细胞成骨相关基因及蛋白 Runx2、OCN 和 OPN 的表达情况。并用 Western blot 法检测 BMP7 下游信号通路中 Smad1/5/8 的磷酸化水平。结果：BMP7 和 Runx2 蛋白在 CAVD 组中表达明显高于 non-CAVD 组。成功分离出原代猪主动脉瓣膜间质细胞，α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）及波形蛋白（vimentin）染色阳性，血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）染色阴性。转染 BMP7-siRNA 后猪主动脉瓣膜间质细胞中 BMP7 的 mRNA 和蛋白水平均明显下调，早期及晚期成骨分化能力均明显降低。沉默 BMP7 基因的表达，可下调 Runx2、OCN 和 OPN 的基因及蛋白表达，且磷酸化的 Smad1/5/8(p-Smad1/5/8)蛋白水平明显降低。结论：*BMP7* 基因沉默抑制钙盐诱导的主动脉瓣膜间质细胞的成骨分化能力，BMP7/Smads 信号通路可能在该过程中发挥重要作用。

关键词 钙化性主动脉瓣膜病；瓣膜间质细胞；BMP7；成骨分化；RNA 干扰

钙化性主动脉瓣膜病（calcific aortic valve disease，CAVD）是主动脉瓣的退行性病变，主要表现为瓣叶纤维增生与钙化导致瓣膜僵硬，严重者可发生钙化性主动脉瓣狭窄（calcific aortic valve stenosis, CAVS），引起左室流出道梗阻[1]。随着人口老龄化，在发达国家 CAVD 已经成为仅次于冠心病和高血压的第三大心血管疾病，75 岁以上的人群发病率为 2.8%,并且随着年龄增长而逐渐升高[2]。而一项利用超声心动图对北京地区老年人群的随机抽样检查显示：心脏瓣膜钙化发病率 60 岁以上人群为 43.4%，70 岁以上人群高达 82.3%，并且多为主动脉瓣受累[3]。目前对 CAVD 没有合适的药物治疗，外科主动脉瓣置换术是治疗 CAVD 唯一有效的方法[4,5]，但其存在终身抗凝（机械瓣）或再次手术（生物瓣）等风

国家自然科学基金项目（NSFC81672103）
重庆市技术创新与应用示范项目（cstc2018jscx-msybX0113）
通讯作者电子邮箱：yaguangweng@126.com

险高、费用高昂的问题；并且由于患者高龄、健康状况差、合并众多疾病等原因，有近 1/3 患者不能接受外科手术[6,7]。因此，探讨 CAVD 发生发展的机制尤为重要，并有可能为临床提供新的干预及治疗策略。

瓣膜间质细胞（valve interstitial cells，VICs）是存在于心脏瓣膜的类似于成纤维细胞的干细胞，对于维持瓣膜正常功能具有重要作用[8]。越来越多的研究显示瓣膜间质细胞不仅会向纤维细胞方向分化，以补充衰老的心瓣膜纤维细胞，它还能向成骨表型方向分化，被认为是心脏瓣膜钙化过程中的主要细胞[9].

骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMPs）是转化生长因子-β(TGF-β)超家族中的一员,因其能诱导骨、软骨形成以及皮下、肌肉等部位异位骨的形成而得名。至今已发现 15 种 BMP 及 40 种 BMP 相关蛋白,它们对多数细胞的增殖、分化、凋亡及胚胎发育、器官形成等起重要的调节作用。手术中摘取的钙化主动脉瓣膜组织学研究证实钙化主动脉瓣膜中 BMP-2、BMP-4 以及骨细胞外基质分子的表达增加[10]，并且 Osman 等通过体外研究证实 BMP2/4 可以明显促进 VICs 表达成骨指标—碱性磷酸酶(ALP)、Runx2、OPN 等[11]，因此,目前认为成骨相关蛋白的积累,是瓣膜钙化导致功能障碍的主要发病机制之一，但其具体机制尚未清楚。已有研究[12]表明，代谢综合征、糖尿病与主动脉钙化的发病风险增加有关，大量研究发现 BMP7 在肾脏高糖损伤与前列腺肿瘤发生进展及其调控等老年疾病中发挥着重要作用[13-15]，BMP7 生物学效应主要是通过与 II 型受体结合，使 I 型受体发生磷酸化，该信号转导过程还涉及 TGF-β信号通路中的转录因子 Smads，包括受体调节性 Smads(Smadl，Smad5)，共同作用性 Smad(Smad4)和抑制性 Smad(Smad6)[16]。但目前的报道中尚未有关于 BMP7 在心脏瓣膜钙化中的作用及机制研究。

本研究发现在钙化瓣膜组织中存在 BMP7 异常高表达，因此我们推测 BMP7 可能是促进瓣膜钙化的重要因子；由于瓣膜间质细胞的成骨分化被认为是心脏瓣膜钙化过程中的关键环节，所以我们采用猪 VICs 为主要研究对象，体外钙盐诱导 VICs 成骨分化后干扰 BMP7,探讨 BMP7 对 VICs 成骨分化的影响及其分子机制，为 CAVD 的干预及治疗提供新的理论依据。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人瓣膜组织与猪瓣膜间质细胞来源:

非CAVD瓣膜组织(non-CAVD组)取自重庆医科大学附属第一医院经手术治疗的主动脉夹层患者，排除瓣膜组织纤维性增厚，主动脉瓣反流者。CAVD瓣膜组织(CAVD组)取自因钙化性主动脉瓣狭窄而进行主动脉瓣膜置换术的患者。术中取下主动脉瓣后，用生理盐水漂洗数次，观察瓣膜形态，并取一部分组织放入多聚甲醛中固定，用于瓣膜形变分数评估，其余组织立即投入液氮保存，待收集到一定数量，取出用于实验。

猪主动脉瓣取自重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场，选取8～10月龄健康家猪6只，体质量100～120kg，取主动脉瓣膜。

1.1.2 主要试剂:

Ⅰ型胶原酶、β-磷酸甘油、链霉素、青霉素、茜素红S染料、维生素C、胰蛋白酶、二甲基亚砜（DMSO）均购自美国Sigmag公司，M199培养基购自美国Hyclone公司，澳洲胎牛血清购自Gibco公司。干扰BMP7基因的干扰RNA和阴性对照干扰RNA均购自广州市锐博生物科技有限公司。兔抗人α-SMA、vWF抗体、鼠抗人vimentin，山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG均购自万类生物科技公司。鼠抗人BMP7、p-Smad1/5/8抗体和Smad1/5/8抗体均购自SantaCruz公司。兔抗人Runx2、OCN、OPN均购自Abcam公司。鼠抗人GAPDH、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠和山羊抗兔IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司，聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride，PVDF)膜、化学发光试剂盒均购自Milipore公司。Trizol试剂、逆转录试剂盒、SYBRGreenⅡ均购自TaKaRa公司，qPCR引物由深圳华大基因公司合成。碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒购于碧云天生物科技有限公司。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 主动脉瓣膜间质细胞分离与培养

于重庆市璧山区动物检疫定点屠宰场处死家猪30min内，无菌条件下摘取主动脉瓣叶，立即置于含双抗的新鲜培养基中保存。迅速带回实验室，立即取出瓣膜行PBS清洗，Ⅰ型胶原酶2mg/mL 37℃孵育30min；无菌棉签擦拭刮除瓣膜表面内皮细胞，并将瓣膜剪成2mm×2mm小块组织，再次置于胶原酶中孵育过夜；次日吹打离心，加入M199培养基重悬，置于培养皿中种植。常规培养基为含10%FBS，1%青霉素/链霉素的M199培养基，细胞培养箱条件为37℃、5% CO_2，

隔日换液 1 次；待细胞融合至约 80%密度传代。经鉴定明确的第 3～6 代主动脉瓣膜间质细胞用于后续实验。

1.2.2 免疫组化

切片脱蜡至水，微波抗原修复，滴加过氧化氢去除内源性过氧化物酶，滴加相应血清进行特异性背景封闭，滴加相应的一抗工作液，4℃过夜，滴加酶标二抗，室温孵育 30min，滴加 DAB，镜下观察染色程度，合适后放入水中终止染色，苏木素复染，脱水，透明，封片。

1.2.3 免疫荧光染色鉴定细胞表型

原代主动脉瓣膜间质细胞种植培养，形成 50%细胞密度的爬片；4%多聚甲醛固定 30min；0.5%Triton-X100 破膜处理 20min；3%H_2O_2 处理内源性过氧化氢酶 15min；室温下山羊血清封闭 30min；加入 1∶100 稀释的一抗（兔抗人α-SMA、vWF 抗体，鼠抗人 vimentin 抗体），4℃孵育过夜；加入 1∶100 稀释的二抗（荧光染料标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 抗体），室温避光孵育 2h；最后加入 DAPI 复染细胞核；荧光显微镜下观察α-SMA、Vimentin、vWF 表达情况。

1.2.4 瓣膜间质细胞的成骨分化诱导

取对数生长期的瓣膜间质细胞置于钙盐诱导培养基中进行培养，待细胞密度至 30%～50%进行其他处理。钙盐诱导培养基中加入 10mmo/L β-甘油磷酸钠、50μg/mL 维生素 C，作为条件培养基进行细胞培养，诱导细胞成骨分化。

1.2.5 siRNA 转染及实验分组

将处于对数生长期的 VICs 细胞用 0.25%的胰酶消化、离心、重悬，并以每孔 2×10^5 的密度铺于 6 孔板中。选择对数生长期的 VICs 细胞，当细胞融合度达 70%时，转入干扰 RNA，以不转染组和转染阴性对照干扰 RNA 作为空白对照和阴性对照。转染 24～48h 后，提取细胞总 RNA，用于后续 qPCR 检测;转染 48～72h 后，提取细胞总蛋白，用于后续的 Westernblot 检测。Negative siRNA 的模板链序列为 5’-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3’,反义链序列为 5’-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3’;BMP7-siRNA 的模板链序列为 5’-GGCUAUGCCGCCUACUACU-3’，反义链序列为 5’-AGUAGUAGGCGGCAUAGCC-3’。转染实验分 3 组:(1)Control 组，即未转染任何 siRNA 的 VICs 细胞;(2)Negative Control 组，即转染了 Negative siRNA 的

VICs 细胞;(3)BMP7-siRNA 组，即转染了 BMP7-siRNA 的 VICs 细胞。

1.2.6 qPCR 法检测细胞中 BMP7 以及相关成骨分化因子的 mRNA 表达

TRizol 法提取各组细胞的总 RNA，两步法逆转录成 cDNA 后进行 qPCR 扩增。以 GAPDH 为内参照，检测各组细胞 BMP7、Runx2、OCN、OPN 的表达水平，Q-PCR 反应体系为 10μL，反应条件为：95℃ 30s；95℃ 5s，60℃ 30s，40 个循环；72℃ 30s，实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列（猪）

Table1 The sequence of Primers for PCR(pig)

Gene	Forward primer(5 'to 3')	Reverse primer(5' to 3')
BMP7	GACTTCAGCCTGGACAACGA	AGGTCCAGCATGAACATGGG
Runx2	GCACTACCCAGCCACCTTTA	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG
OCN	TCACACTGCTTGCCCTACTG	TGCCATAGAAGCGCCGATAG
OPN	GAGCAAACAGACGATGTGGA	GACCAGCTCATCGGATTCAT
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTGAACG	CGTGGGTGGAATCATACTGGA

1.2.7 Western blot 法检测 BMP7 以及相关成骨分化蛋白的表达

提取各组细胞的总蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白的上样量均为 250μg，计算出蛋白上样体积。SDS-PAGE 分离目的蛋白，恒流(210mA)电转至 PVDF 膜，5%BSA 封闭 2h，一抗 4℃孵育过夜（稀释比例为：BMP7 1：500，Runx2 1:500,OCN 1：1000，OPN 1:1000,p-Smad1/5/8 1:1000，Smad1/5/8 1:1000，GAPDH 1:1000），洗膜，二抗 37℃孵育 1h（稀释比例为 1:5000），洗膜，化学发光显影，Quantity one 软件计算出各电泳条带的灰度值，并与内参 GAPDH 的灰度值相比，得出各蛋白的表达水平，实验重复 3 次。

1.2.8 ALP 染色

将 VICs 细胞接种于 24 孔板后，待细胞密度达到 70%时进行不同的处理，6h 后换液，同时加入工作浓度 50μg/ml 的维生素 C、10mmol/L 的β-磷酸甘油，培养 7d 后，弃去培养基用 PBS 冲洗 2 次，4℃100%乙醇固定 1h，每孔加入 NBT/BCIP 溶液 200μl 进行 ALP 染色，避光 30min 后观察染色结果。

1.2.9 茜素红 S 染色

将 VICs 细胞接种于 24 孔板，细胞融合度达到 70%时给予不同的处理，6h 后换液，同时加入工作浓度 50μg/ml 的维生素 C、10mmol/L 的β-磷酸甘油，继续培养 14d 进行茜素红 S 染色:弃去孔板中的培养基，PBS 冲洗 3 次后用 4℃ 0.05%戊二醛固定 10min，去离子水洗 3 次后加入 0.4%茜素红 S 染液，染色 5min，弃去染液，去离子水终止反应并洗涤，显微镜下观察并成像。

1.2.10 统计学处理

采用 SPSS20.0 和 GraphPad 软件对实验数据进行统计分析。计量资料用均数±标准差(mean±SD)表示。采用 t 检验进行两组间比较，多组间比较采用单因素方差分析。以 P＜0.05 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 BMP7 和 Runx2 蛋白在钙化瓣膜组织中表达明显高于非钙化瓣膜组织

免疫组化结果显示，CAVD 组中 BMP7 的蛋白水平显著高于 non-CAVD 组,见图 1(a);Western blot 结果显示,CAVD 组中 BMP7 的蛋白表达水平较 non-CAVD 组明显升高(P＜0.001)，见图 1（b）。结果提示，BMP7 可能是促进瓣膜钙化的指标。

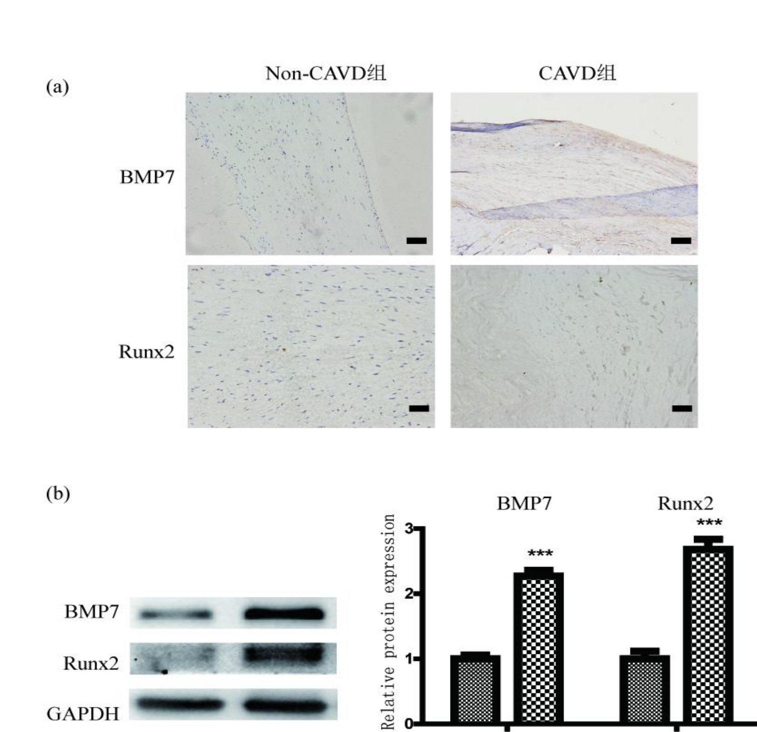


图 1 BMP7 和 Runx2 蛋白在 CAVD 组中表达明显高于 non-CAVD 组

Fig.1 The expression of BMP7 and Runx2 protein in CAVD group was significantly higher than that in non-CAVD group

(a)The expression of BMP7 and Runx2 in CAVD group and non-CAVD group detected by immunohistochemistry(×200) Scale bar represented 50μm;(b)The expression of BMP7 and Runx2 detected by Western Blot;Mean±SD．n=3．***P<0.001 vs non-CAVD group.

2.2 原代猪主动脉瓣膜间质细胞的形态特征及表型鉴定

细胞接种 24h 后完全贴壁，细胞呈梭形或椭圆形，放射状走行，5d 左右汇合成单层,见图 2（a）；细胞免疫荧光染色检测示，所培养细胞的细胞质中，间质细胞特异性蛋白标志物α-SMA 阳性表达,见图 2（b）；Vimentin 阳性表达，见图 2（c）；而内皮细胞特异性标志物 vWF 无表达，见图 2（d）。

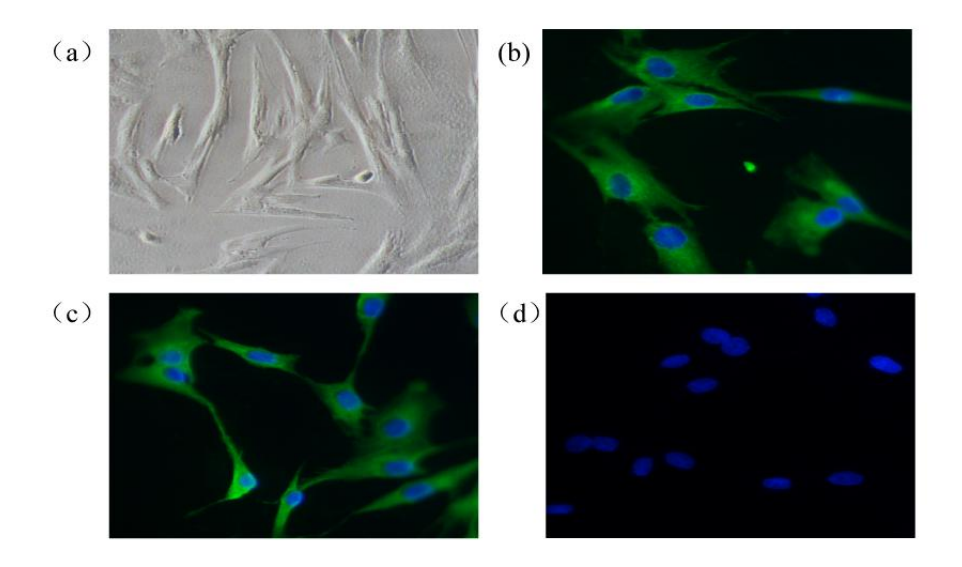


图 2 猪主动脉瓣膜间质细胞形态及表型鉴定

Fig.2 Morphological and phenotypic characterization of porcine aortic valve interstitial cells

(a)Light microscopy image(×100) of VICs ；(b)Immunofluorescence staining of α-SMA(×200) ；(c)Immunofluorescence staining of Vimentin(×200)；(d)Immunofluorescence staining of vWF (×200)

2.3 BMP7-siRNA 在 VICs 细胞中转染效果验证

qPCR 结果显示，BMP7-siRNA 组中 BMP7 的 mRNA 表达水平均较空白对照组和阴性对照组显著降低(P＜0.01)，见图 3（a）;Western blot 结果显示，BMP7-siRNA 组 VICs 细胞中 BMP7 蛋白的表达水平与空白对照组和阴性对照组相比显著降低(P＜0.01)，见图 3（b）。这一结果表明，BMP7-siRNA 转染能有效干扰 VICs 细胞中 BMP7 的 mRNA 和蛋白表达。

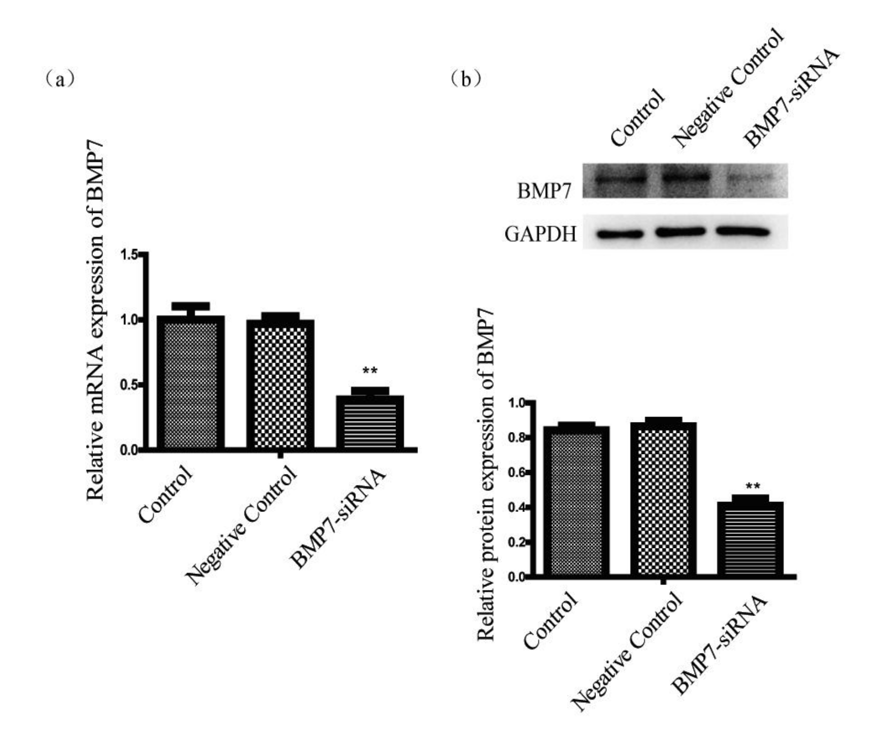


图 3 VICs 细胞转染 BMP7-siRNA 后 BMP7 的 mRNA 和蛋白表达水平

Fig.3 Transfection with BMP7-siRNA decreased BMP7 expression in the valve interstitial cells.

(a)The mRNA expression of BMP7 was detected by qPCR; (b)The protein expression was determined by Westernblot. Mean±SD. n=3. **P<0. 01 vs control group or negative control group.

2.4 BMP7 表达下调可抑制 VICs 细胞的早期及晚期成骨分化能力

在成骨培养基诱导 VICs 细胞成骨分化的过程中，转染 BMP7-siRNA 后 7d，与空白对照组和阴性对照组相比，BMP7-siRNA 组可显著减弱 ALP 染色，见图 4(a)；转染 BMP7-siRNA 并用成骨培养基诱导 VICs 细胞成骨分化 14d，茜素红 S 染色检测发现与空白对照组和阴性对照组相比，BMP7-siRNA 组明显减少了细胞的钙盐沉积，见图 4（b）。

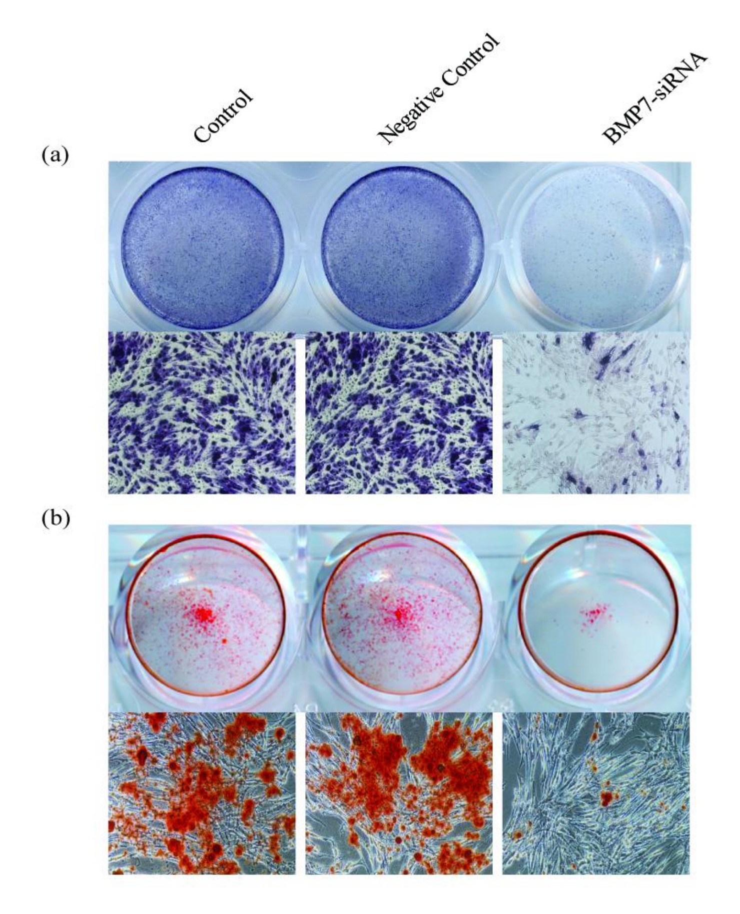


图 4 BMP7 表达下调抑制 VICs 细胞的早期及晚期成骨分化能力

Fig.4 The effect of BMP7-siRNA on the early and late osteogenic differentiation abilities of the valve interstitial cells

(a) The cell early osteogenic differentiation ability was measured by ALP staining(×100); （b） The cell late osteogenic differentiation ability was measured by Alizarin red S staining(×100)

2.5 BMP7 表达下调可抑制 VICs 细胞成骨相关基因及蛋白的表达

在成骨培养基诱导 VICs 细胞成骨分化的过程中，转染 BMP7-siRNA 2d 后，qPCR 结果显示，BMP7-siRNA 组中成骨相关基因 Runx2、OCN、OPN 的表达水平均较空白对照组和阴性对照组降低(P＜0.01、P＜0.05、P＜0.05)，见图 5（a）;Western blot 结果显示，BMP7-siRNA 组 VICs 细胞中 Runx2、OCN、OPN 蛋白表达水平与空白对照组和阴性对照组相比显著降低(P＜0.01、P＜0.001、P＜0.01)，见图 5（b）。

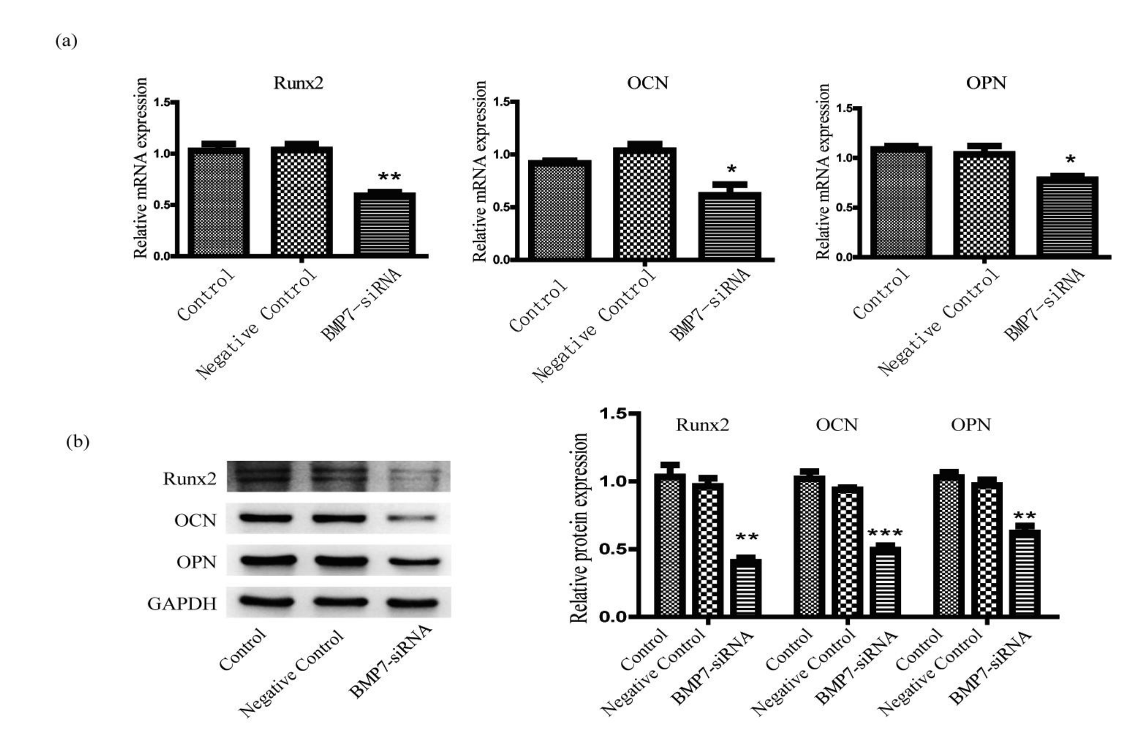


图 5 BMP7 表达下调抑制 VICs 细胞成骨相关基因及蛋白的表达

Fig.5 The downregulation of BMP7 inhibits the expression of osteoblast-related genes and proteins in valve interstitial cells.

(a) The mRNA expression of Runx2，OCN and OPN was detected by qPCR;(b)The protein expression was determined by Western blot．Mean±SD．n=3．*P<0.05,**P<0.01, ***P<0.001 vs control group or negative control group．

2.6 BMP7 表达下调对 BMP-smad1/5/8 信号通路的影响

在成骨培养基诱导 VICs 细胞成骨分化 3d 时，Western blot 检测蛋白表达水平，结果显示，与对照组相比，BMP7-siRNA 明显抑制 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平（P＜0.01），而细胞的总 Smad1/5/8 蛋白表达量没有明显变化，结果提示 BMP7 可能通过 BMP-smad1/5/8 信号通路来调节 VICs 细胞的成骨分化。

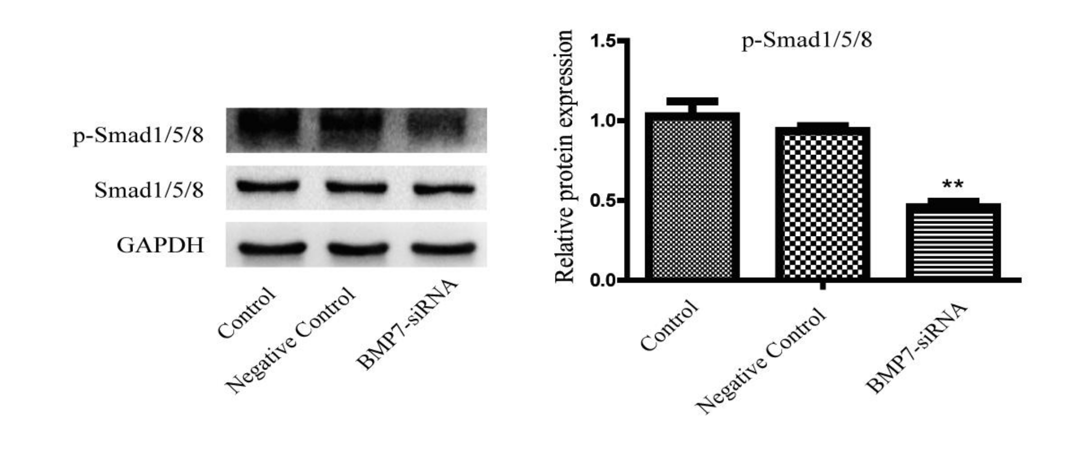


图 6 BMP7 表达下调对 BMP-smad1/5/8 信号通路的影响

Fig.6 The effect of BMP7-siRNA on BMP-smad1/5/8 signaling pathway

The expression and activation of Smad1/5/8 protein was detected by Western blot.P＜0．01 vs control group or negative control group.

3.讨论

随着人口老龄化，CAVD 成为主要的心血管疾病之一，由于 CAVD 发病早期比较隐匿，现有检测手段很难对其作出早期有效的诊断，出现临床症状后，患者唯一的选择就是进行瓣膜置换术。因此研究该疾病的病理生理机制及探索治疗靶点十分必要。以前人们认为心脏瓣膜钙化是一个被动的自然衰老过程。但是最近国内外许多报道证实了心脏瓣膜钙化是个异位钙化的过程，并且研究发现：心脏瓣膜中含有骨相关蛋白，故认为主动脉瓣钙化类似于成骨，是一个主动的可逆的病理过程[17]，涉及瓣膜间质细胞和内皮细胞转分化、细胞外基质重塑、新生血管形成、血流机械应力改变、脂质浸润、钙磷代谢紊乱、炎性刺激等[18,19]。随着人们对 CAVD 研究的不断深入，BMP 蛋白家族在其发生发展中的作用越来越被重视。然而，现阶段已有的 BMPs 对瓣膜钙化作用的研究大多仅仅只限形态学染色的观察，而没有深入到机制上对 BMPs 在瓣膜钙化过程中所扮演的角色进行阐述。

本研究发现，BMP7 蛋白在钙化瓣膜组织中表达明显高于非钙化瓣膜组织，因此推测 BMP7 可能会促进 VICs 细胞成骨分化，从而促进钙化性主动脉瓣膜疾病的发生发展。由于正常人主动脉瓣膜间质细胞来源有限，我们选择了在 BMP7 蛋白表达的氨基酸序列与人体组织有高度同源性的猪主动脉瓣膜间质细胞作为研究对象，进行了细胞成骨分化的观察与研究。在成骨培养基诱导 VICs 细胞成骨分化的过程中，采用小干扰 RNA 特异性干扰 VICs 细胞株中 BMP7 的表达后,ALP 染色和茜素红 S 染色实验结果表明干扰 BMP7 后 VICs 细胞的早期及晚期成骨分化能力显著降低;qPCR 和 Western blot 实验结果表明干扰 BMP7 后 VICs 细胞成骨相关基因及蛋白 Runx2、OCN、OPN 的表达明显下降；同时 p-Smad1/5/8 水平显著降低，提示经典成骨信号通路 BMP-Smads 可能参与了 BMP7 调节 VICs 成骨分化的过程，但是否有其他成骨信号通路(如 Wnt-β-catenin，Notch，MAPK 等）参与其中目前尚未清楚,其具体机制也有待进一步研究。

综上所述，本实验证实 BMP7 基因沉默能够显著抑制 VICs 细胞早期成骨分

化及晚期成骨分化能力，这一作用机制可能与 BMP-Smads 信号通路的阻断有关。本实验为 CAVD 的临床治疗提供了一个新的潜在靶点，若能抑制瓣膜间质细胞 BMP7 的表达或者阻断 BMP-Smads 信号通路，可能会干预及延缓瓣膜钙化进程。但是 BMP7 的具体作用机制还有待于进一步研究探讨。

参考文献：

[1] Yutzey K E, Demer L L, Body S C, et al. Calcific aortic valve disease a consensus summary from the alliance of investigators on calcific aortic valve disease[J].Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2014, 34(11):2387-2393.

[2]Peltonen T, Ohukainen P, Ruskoaho H,et al. Targeting vasoactive peptides for managing calcific aortic valve disease [J]. Ann Med. 2017 Feb; 49(1):63-74.

[3]Li Kang, YANG Chong-qing, LU An-huai, et al.Age-related changes in calcification of heart valves[J].Chin J Geriatr,2013, 32(9)：934-936.(in chinese)李康，杨重庆，鲁安怀，等.心脏瓣膜钙化的增龄性改变 [J]. 中华老年医学杂志，2013, 32(9)：934-936.

[4]Horne A,Reineck EA,Hasan RK,et al.Transcatheter aortic valve replacement:Historical perspectives,current evidence,and future directions[J].Am Heart J,2014,168:414-423.

[5]Adams DH,Popma JJ,Reardon MJ,et al.Transcatheter aortic valve replacement with a self-expanding prosthesis[J].N Engl J Med,2014,370:1790-1798

[6] Lu Yang,Fu Qiao-mei.Investigation and Analysis of the Compliance of Anticoagulant Therapy for Patients Underwent Cardiac Valve Replacement[J].Nursing Journal of Chinese People's Liberation Army,2016,33(8):62-64.(in chinese)陆洋，傅巧美．心脏瓣膜置换术后患者抗凝治疗依从性的调查分析[J]．解放军护理杂志，2016,33(8):62-64.

[7]He C, Tang H, Mei Z， et al. Human interstitial cellular model in therapeutics of heart valve calcification [J].Amino Acids. 2017 Dec; 49(12):1981-1997.

[8]Leopold J A. Cellular mechanisms of aortic valve calcification[J].Circ Cardiovasc Interv,2012, 5(4):605-614.

[9]Liu AC， Joag VR， Gotlieb AI． The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology[J]． Am J Pathol，2007，171(5) : 1407-1418．

[10]Mohler ER 3rd， Gannon F， Reynolds C， et al. Bone formation and inflmmation in cardiac valves[J]． Circulation，2001， 103 (11) :1522 -1528．

[11]Lana Osman, Magdi H. Yacoub, Najma Latif, et al. Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin.Circulation.2006 Jul 4;114(1 Suppl): I547-52.

[12]Katz R， Budoff MJ，Takasu J，et al. Relationship of metabolic syndrome with incident aortic valve calcium and aortic valve calcium progression:the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [J]． Diabetes，2009，58(4) : 813-819

[13]Wang SN, Lapage J, Hirschberg R.Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nepropathy .J Am Soc Nephrol, 2001, 12, 2392 -2399

[14] Morrissey C， Brown LG， Pitts TE， et al. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment[J]． Neoplasia，2010， 12(2) : 192 - 205．

[15]Ye L，Lewis-Russell JM， Sanders AJ， et al. HGF /SF up-regulates the expression of bone

morphogenetic protein 7 in prostate cancer cells[J]．Urol Oncol，2008，26(2) : 190 - 197
[16]Miyazonok K ,Kusanagi K, Inoue H .Divergence and convergence of TGFb/ BMP signaling .J Cell Physiol, 2001, 187(3),265-276
[17]Bowler M A， Merryman W D.In vitro models of aortic valve calcification： solidifying a system[J].Cardiovasc Pathol，2015，24(1)：1-10.
[18]Pawade T A，Newby D E，Dweck M R.Calcification in Aortic Stenosis：The Skeleton Key[J].J Am Coll Cardiol，2015，66(5)：561-577.
[19] SIDER K L，ZHU C，KWONG A V， et al.Evaluation of a porcine model of early aortic valve sclerosis[J].Cardiovasc Pathol，2014，23(5)：289-297.

BMP7 gene silencing inhibits osteogenic differentiation of porcine arotic valve interstitial cells induced by osteogenic induction medium

Cheng Yu, Shi Qiong, An Li-qin, Fan Meng-tian, Huang Gai-gai, Weng Yaguang*

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medicine University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective :To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA) -mediated bone morphogenetic protein7 (*BMP7*) gene silencing on osteogenic differentiation of porcine aortic valve interstitial cells induced by osteogenic induction medium,and to provide a theoretical basis for the intervention and treatment of calcific aortic valve disease. Methods: The non-CAVD valvular tissues (non-CAVD group) were taken from patients with surgical treatment of aortic dissection， the CAVD valvular tissues (CAVD group) were taken from patients undergoing aortic valve replacement because of calcified aortic valve stenosis． The expression levels of BMP7 and Runx2 in the non-CAVD group and CAVD group were tested by immunohistochemistry and Western blot. Healthy domestic pigs were sacrificed and the aortic valve leaflets were aseptically removed immediately.The aortic valve interstitial cells(VICs) were isolated by continuous collagenase digestion,its

morphological characteristics were observed and the phenotypes were identified by immunofluorescence staining. VICs were transfected with BMP7-siRNA by liposome method. The expression of BMP7 at mRNA and protein levels in the VICs transfected with BMP7-siRNA was detected by qPCR and Western blot, respectively. The conditioned medium induced osteogenic differentiation of VICs for the establishment of calcification model of aortic valve interstitial cells in vitro,then Alkaline phosphatase (ALP)staining and Alizarin red S staining was used to evaluate the cell early and late osteogenic differentiation abilities.The mRNA and protein levels of Runx2 ,OCN and OPN were determined by qPCR and Western blot ,respectively. The protein levels of p-drosophila mothers against de-capentaplegic 1/5/8 (p-Smad1/5/8) was also determined by Western blot. Results: The expression of BMP7 and Runx2 in CAVD group was significantly higher than that in non-CAVD group.The primary porcine aortic valve interstitial cells were successfully isolated and the staining of α-smooth muscle actin (α-SMA) and Vimentin were positive,the staining of von Willebrand factor (vWF) was negative.The expression of BMP7 at mRNA and protein levels in the VICs transfected with BMP7-siRNA was significantly decreased, and the cell early and late osteogenic differentiation abilities were significantly decreased. The mRNA and protein levels of Runx2, OCN and OPN were significantly reduced. Meanwhile, the protein levels of p-Smad1/5/8 were down-regulated. Conclusion: *BMP7* gene silencing obviously inhibits the osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells induced by osteogenic induction medium.The BMP7/Smads signaling pathways may play an important role in these processes.

Key words calcific aortic valve disease; valve interstitial cell; BMP7; osteogenic differentiation; RNA interference